



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : B01J 20/26, B01D 61/14, C12N 15/10	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/44492 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09288 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. November 1999 (30.11.99) (30) Prioritätsdaten: 199 02 917.2 26. Januar 1999 (26.01.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BENGs, Holger [DE/DE]; Bindingstrasse 3, D-60598 Frankfurt (DE). BÖHM, Gitta [DE/DE]; Im Burgfeld 243, D-60439 Frankfurt (DE). GRANDE, Jürgen [DE/DE]; Am Hübchenbusch 36, D-65812 Bad Soden (DE). SCHUTH, Silke [DE/DE]; Hauptstrasse 30, D-56412 Ruppach-Goldhausen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, NO, NZ, PL, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: WATER-INSOLUBLE LINEAR POLYSACCHARIDES FOR FILTRATION (54) Bezeichnung: WASSERUNLÖSLICHE LINEARE POLYSACCHARIDE ZUR FILTRATION (57) Abstract <p>The invention relates to the use of water-insoluble, linear polysaccharides as a filtering agent, to a method for producing said filtering agent and to a filtering device. The inventive filtering agent have a high capacity for adsorption and retention.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung wasserunlöslicher, linearer Polysaccharide als Filtermittel sowie ein Verfahren zu deren Herstellung und eine Filtervorrichtung. Das Filtermittel weist ein hohes Adsorptions- und Retentionsvermögen auf.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Wasserunlösliche lineare Polysaccharide zur Filtration

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung wasserunlöslicher linearer Polysaccharide als Filtermittel.

10 Filterverfahren zur Trennung von Feststoffteilchen oder von gelösten Stoffen aus Flüssigkeiten oder Gasen spielen auf vielen technischen Gebieten, beispielsweise der Abwasserreinigung eine große Rolle. Von besonderer Bedeutung ist die Trennung gelöster, kolloidaler oder suspendierter Teilchen aus Flüssigkeiten insbesondere auf den Gebieten der analytischen Chemie, der Biotechnologie und der Molekularbiologie, beispielsweise zum Ernten von Mikroorganismen oder zur Isolierung von Nukleinsäuren und Proteinen.

15 Als Filtermittel werden in der Regel poröse Medien eingesetzt, die von der die abzutrennenden Stoffe enthaltenden flüssigen oder gasförmigen Phase durchströmt werden. Abhängig von der Art des Filtermittels passieren Gas-, Flüssigkeits- oder Lösungsmittelmoleküle durch die Poren des Filtermittels, während dispergierte oder
20 gelöste Teilchen an der Oberfläche des porösen Mediums oder in seinem Inneren zurückgehalten werden.

Filtermittel, wie sie bei üblichen Trennverfahren verwendet werden, sind beispielsweise Papier, Gewebe oder Vliese aus Metall-, Natur-, Kunst- und
25 Glasfasern, Membranen, beispielsweise aus Celluloseacetat, oder gesintertes Glas oder Porzellan.

Für Anwendungen in der analytischen Chemie oder der Molekularbiologie werden häufig besonders feinporige oder mikroporöse Filtermittel benötigt, beispielsweise für
30 Mikrofiltrationen.

In den für solche Zwecke bekannten Filtervorrichtungen kommen in erster Linie vorkonfektionierte Filtermittel zum Einsatz, die beispielsweise aus synthetischen oder halbsynthetischen Polymeren bestehen. Häufig handelt es sich bei den Materialien um Gewebe aus synthetischen oder natürlichen Fasern, die zusätzlich

mit einem Bindemittel verklebt sein können. Im allgemeinen werden aus dem Gewebe Scheiben geschnitten und beispielsweise in einem Probenröhrchen positioniert.

- 5 Auch die Verwendung von chemisch modifizierten Polysacchariden, beispielsweise von Cellulosederivaten wie Nitrocellulose oder Celluloseacetat oder von chemisch vernetzter Amylose, als Filtermittel ist bekannt.

10 Die EP-A-826 412 und die WO 98/08594 Verfahren zur Herstellung von Filterelementen, bei denen Substanzen wie Mikropartikel, beispielsweise in Suspensionen oder in Hydrokolloiden, schwammartig zu mikroporösen Elementen verfestigt werden. Geeignete Mikropartikel bestehen u.a. aus Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, Glas, Graphit, Calciumphosphat oder Zinkpolyphosphat oder aus organischen Materialien wie hochvernetzten Polysaccharide, wie sie beispielsweise
15 unter dem Handelsnamen SUPERDEX® erhältlich sind.

Die JP-A-57,063,302 beschreibt Mikropartikel aus Amylose mit einem Quellungsgrad von > 5 zur Verwendung bei der Gelfiltration. Zur Herstellung der Mikropartikel wird die Amylose zunächst aus Stärke isoliert. Anschließend werden wässrige alkalische
20 Lösungen der Amylose zur Bildung der Mikropartikel in Medien, in denen sich die Amylose nicht oder nur schlecht löst, suspendiert, und anschließend werden die Partikel durch chemische Vernetzung, beispielsweise mit Epichlorhydrin, wasserunlöslich gemacht. In ähnlicher Weise beschreibt auch die RO-A-61,524 die Verwendung von mit Epichlorhydrin vernetzter Amylose zur Gelfiltration.

25 Die US-A-3,350,221 beschreibt die Verwendung von Stärke mit hohem Amylosegehalt zusammen mit einem Melamin/Formaldehyd-Harz zur Bildung von Filterfolien. Dabei vernetzt das Melaminharz offensichtlich mit den Hydroxylgruppen der Stärke und ergibt dadurch eine wasserstabile Filterfolie. Die JP-A-06,329,561
30 beschreibt Mittel zur Trennung optischer aktiver Verbindungen. Dabei werden Polysaccharide wie Cellulose oder Dextran chemisch an Silicagel gebunden. Die Trennung optischer Isomere mit Amylose-beschichtetem Silicagel wird in der JP-A-0,346,950 beschrieben.

Die GB-A-2 247 242 beschreibt Mikropartikel aus Amylose, die durch Einwirkung einer Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase aus Cyclodextrin oder Stärke erhalten werden. Diese wasserlöslichen Mikropartikel können in Lebensmitteln, Pharmazeutika und in Kosmetikartikeln Verwendung finden.

5

Zur Verwendung als Filtermittel müssen die nach dem Stand der Technik eingesetzten Polysaccharide jedoch chemisch modifiziert oder vernetzt werden, um den Anforderungen als Trennmittel zu entsprechen. Dies kann zu verbleibenden Chemikalien und dadurch zu unerwünschten Nebeneffekten führen. Die chemische

10 Modifikation oder Vernetzung führt außerdem zu einer Quellung der Partikel, die häufig unerwünscht ist.

10

Bei der Vielzahl von möglichen Anwendungen, insbesondere auf den Gebieten der analytischen Chemie und der Biotechnologie besteht daher ein großer Bedarf an

15 neuen Filtermaterialien, mit denen alternative Möglichkeiten zur Abtrennung und Reinigung von Stoffen zur Verfügung gestellt werden, damit jederzeit und unter möglichst vielen Bedingungen eine optimale und schonende Trennung und Reinigung des Materials gewährleistet werden kann.

15

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand daher darin, Filtermittel bereitzustellen, die gegebenenfalls auch ohne chemische Modifikation des Ausgangsmaterials zur effizienten Auftrennung von Stoffgemischen geeignet sind, die beständig sind, und die sich vielseitig und vorteilhaft, beispielsweise in der analytischen und präparativen Chemie, Biochemie und Molekularbiologie und

20 insbesondere für Mikrofiltrationen einsetzen lassen.

20

25

Diese Aufgabe wurde mit Hilfe wasserunlöslicher linearer Polysaccharide als Filtermittel gelöst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Filtermittel, die wenigstens ein

30 wasserunlösliches lineares Polysaccharid umfassen.

30

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung von Filtermitteln, umfassend die Schritte:

4

(a) Lösen oder Suspendieren wenigstens eines wasserunlöslichen linearen Polysaccharids in einem geeigneten Lösungs- bzw. Suspensionsmittel; und

5 (b) Verfestigen der Lösung oder Suspension unter Bildung des Filtermittels.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Filtervorrichtungen, die ein Filtermittel enthalten, das wenigstens ein wasserunlösliches lineares Polysaccharid
10 umfaßt.

Unter Filtermitteln werden poröse Medien verstanden, die von einer Flüssigkeit oder einem Gas durchströmt werden können, wobei in der Flüssigkeit oder dem Gas dispergierte, emulgierte, suspendierte oder gelöste Teilchen aufgrund von
15 beispielsweise Sieb-, Affinitäts- und/oder Adsorptionseffekten an der Oberfläche des porösen Mediums oder in seinem Inneren zurückgehalten werden.

Unter Filtervorrichtungen (oder Filtern) werden Vorrichtungen mit wenigstens einem Filtermittel verstanden, die zur Abtrennung von Stoffen aus Flüssigkeiten oder
20 Gasen verwendet werden können.

Unter Polysacchariden werden makromolekulare Kohlenhydrate verstanden, deren Moleküle aus glykosidisch miteinander verknüpften Monosaccharid-Molekülen bestehen.

25 Unter wasserunlöslichen Polysacchariden werden Polysaccharide verstanden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Auflage, 1987) entsprechend den Klassen 4-7 unter die Kategorien "wenig löslich", "schwer löslich", "sehr schwer löslich" und "praktisch unlöslich" fallen.

30 Die Wasserunlöslichkeit der erfindungsgemäß eingesetzten Polysaccharide ist zweckmäßig derart, daß wenigstens 98%, insbesondere wenigstens 99,5%, der eingesetzten Polysaccharide unter Normalbedingungen ($T = 25^{\circ}\text{C} \pm 20\%$; $p =$

101325 Pascal +/- 20%) in Wasser unlöslich sind (entsprechend mindestens den Klassen 4 und 5 nach DAB).

Vorteilhaft entspricht die Wasserunlöslichkeit der eingesetzten Polysaccharide den Klassen 6 oder 7 nach DAB.

Unter linearen Polysacchariden werden Polysaccharide verstanden, deren Verzweigungsgrad maximal 8%, beträgt, d.h. deren Hauptkette maximal 8 Seitenketten auf 100 Monosaccharideinheiten aufweist.

Der Verzweigungsgrad der wasserunlöslichen linearen Polysaccharide beträgt vorzugsweise maximal 4%, insbesondere maximal 1,5%. Bei den erfindungsgemäß bevorzugt verwendeten α -1,4-D-Glucanen und β -1,3-D-Glucanen ist der Verzweigungsgrad in 6-Position maximal 4%, vorzugsweise maximal 2% und insbesondere maximal 0,5%, und der Verzweigungsgrad in den anderen nicht an den Verknüpfungen der Hauptkette beteiligten Positionen, z.B. der 2- bzw. 3-Position im Fall des besonders bevorzugten α -1,4-D-Glucans, ist vorzugsweise jeweils maximal 2% und insbesondere maximal 1%.

Die Präfixe " α ", " β " und "D" beziehen sich hier auf die Verknüpfungen der Hauptkette der erfindungsgemäß verwendeten Polysaccharide.

Zur Herstellung von Filtermitteln geeignet sind sowohl wasserunlösliche lineare Homopolysaccharide als auch Heteropolysaccharide.

Geeignete wasserunlösliche lineare Polysaccharide sind beispielsweise wasserunlösliche lineare Mannane, Pektine, Galactane, Xylane, Fructane, Pullulane, Cellulosen und Amylosen. Dabei kann eine Wasserunlöslichkeit auch durch neuartige Reaktionswege erreicht werden. Insbesondere eignen sich bio- und gentechnische Verfahren, in allgemeinem Verständnis, dazu, unlösliche Strukturen zu erzeugen. Dies erfolgt beispielsweise durch die Herstellung von besonderen Qualitäten, z.B. besonderer Reinheit, und/oder durch die Herstellung besonderer kristalliner Strukturen, die nach bekannten Verfahren nicht erhalten werden können.

Bevorzugte wasserunlösliche lineare Polysaccharide sind wasserunlösliche lineare α -D-Glucane und β -D-Glucane. Besonders bevorzugt sind wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucane, beispielsweise Amylose, und β -1,3-D-Glucane, wobei α -1,4-D-Glucane, ganz besonders bevorzugt sind.

5

Die erfindungsgemäß verwendeten Polysaccharide sind im wesentlichen nicht quellbar oder weisen allenfalls ein geringes Quellvermögen auf. Zweckmäßig ist der Quellungsgrad der eingesetzten Polysaccharide kleiner als 1,0, vorzugsweise kleiner als 0,8 und besonders bevorzugt kleiner als 0,3, wobei der Quellungsgrad des Polysaccharids definiert ist als dasjenige Volumen (in ml), das 1g trockenes Polysaccharid nach 4stündiger Quellung in Wasser einnimmt.

10

15

Besonders bevorzugt sind wasserunlösliche lineare Polysaccharide, beispielsweise α -D-Glucane wie α -1,4-D-Glucane, die keine Verzweigungen aufweisen bzw. deren Verzweigungsgrad so minimal ist, daß er mit herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist.

20

Bevorzugt werden chemisch und/oder physikalisch unmodifizierte wasserunlösliche lineare Polysaccharide eingesetzt. Unter chemischen und/oder physikalischen Modifizierungen werden hierbei insbesondere Derivatisierungen der Polysaccharide durch Einführung spezieller Gruppen, kovalente Fixierungen auf einem Trägermaterial, sowie nachträgliche Vernetzungen verstanden.

25

Für bestimmte Anwendungen können jedoch auch wasserunlösliche lineare Polysaccharide verwendet werden, deren Eigenschaften, beispielsweise Adsorptionseigenschaften, beispielsweise durch Veresterung und/oder Veretherung in einer oder mehreren der nicht an der Bildung der Hauptkette beteiligten Positionen in an sich bekannter Weise chemisch modifiziert sind. Im Falle der bevorzugten α -1,4-D-Glucane kann eine solche Modifizierung beispielsweise in 2-, 3- und/oder 6-Position erfolgen.

30

Die Größe der erfindungsgemäß eingesetzten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide kann in einem weiten Bereich schwanken. Zweckmäßig liegt das

gewichtsmittlere Molekulargewicht M_w (bestimmt mittels Gelpermeationschromatographie im Vergleich zu einer Eichung mit Pullulanstandard) der Polysaccharide zwischen 10^3 g/mol und 10^7 g/mol. Bevorzugt liegt das Molekulargewicht M_w in einem Bereich von 10^4 g/mol bis 10^5 g/mol und besonders bevorzugt von 2×10^4 g/mol bis 5×10^4 g/mol. Ein weiterer vorteilhafter Bereich liegt zwischen 2×10^3 g/mol und 8×10^3 g/mol.

Die Polydispersität M_w/M_n der verwendeten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide kann innerhalb weiter Bereiche variieren. Bevorzugte Werte für die Polydispersität liegen im Bereich von 1,01 bis 50, insbesondere von 1,5 bis 15. Die Verwendung von Polysacchariden mit niedrigerer Polydispersität ist wegen der besseren Reproduzierbarkeit der Produkteigenschaften bevorzugt.

Die wasserunlöslichen linearen Polysaccharide können allein oder in Mischung mit anderen zur Herstellung von Filtermitteln geeigneten Polysacchariden eingesetzt werden. Bevorzugt werden Polysaccharide eines einzigen Typs eingesetzt, insbesondere α -1,4-D-Glucose.

Die erfindungsgemäß verwendeten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide können beliebigen Ursprungs sein.

Beispielsweise können die wasserunlöslichen linearen Polysaccharide aus natürlichen pflanzlichen und tierischen Quellen, die solche Polysaccharide enthalten, durch konventionelle Isolierung und Aufreinigung erhalten werden.

Da die meisten natürlichen Quellen die gewünschten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide aber nicht in den gewünschten Mengen oder in der notwendigen Reinheit enthalten, werden diese Polysaccharide vorteilhaft auf biotechnischem Wege gewonnen. Beispielsweise können die natürlichen Produzenten wasserunlöslicher linearer Polysaccharide gentechnisch derart manipuliert werden, daß sie im Vergleich mit dem unmanipulierten Organismus einen höheren Anteil an nicht oder nur geringfügig verzweigten Polysacchariden enthalten oder einen höheren Reinheitsgrad enthalten.

Die gewünschten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide können auch aus hochverzweigten Polysacchariden durch chemische oder enzymatische Entzweigung, beispielsweise mit Entzweigungsenzymen wie Pullulanasen, iso-Amylasen und Glucohydrolasen, erhalten werden.

5

Bevorzugt werden die erfindungsgemäß eingesetzten Polysaccharide durch Biotransformation oder biokatalytisch hergestellt.

10

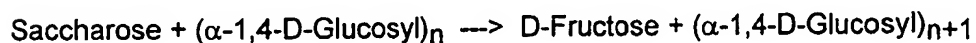
Unter Biotransformation oder biokatalytischer Herstellung wird hier verstanden, daß die wasserunlöslichen linearen Polysaccharide wie die α -1,4-D-Glucane in vitro durch katalytische Polymerisation von Glucosemolekülen, ebenfalls in Form von Saccharose und/oder Glucosederivate, unter Einwirkung eines geeigneten Enzyms, insbesondere eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität, unter geeigneten Bedingungen hergestellt wird.

15

20

Ein vorteilhaftes Verfahren zur Gewinnung wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane wird in der WO 95/31553 beschrieben, auf deren Offenbarungsgehalt ausdrücklich Bezug genommen wird. Nach dem Verfahren der WO 95/31553 wird das α -1,4-D-Glucan mittels eines biokatalytischen Verfahrens aus Saccharose unter Einwirkung eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität, insbesondere mit einer Amylosucrase aus Bakterien der Spezies *Neisseria polysaccharea*, hergestellt. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucanen, indem sie unter Freisetzung von D-Fructose den Glucosylrest des Saccharosemoleküls gemäß dem folgenden Reaktionsschema

25



auf die wachsende Polymerkette übertragen.

30

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Gewinnung wasserunlöslicher linearer α -1,4-D-Glucane auf Grundlage des obigen Reaktionsschemas wird in der älteren, nicht vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung 19827978.1-42 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt hier ausdrücklich zum Gegenstand der

vorliegenden Beschreibung gemacht wird. Hierbei werden die wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucane aus Saccharose mittels Enzymen mit Amylosucrase-Aktivität, bevorzugt aus *Neisseria polysaccharea*, in wässrigen, pufferfreien Systemen synthetisiert. Die Reaktion kann auch in Gegenwart eines wasserlöslichen linearen oder verzweigten α -1,4-D-Glucans, beispielsweise eines wasserlöslichen Dextrins oder einer wasserlöslichen Amylose durchgeführt, da solche Glucane als Glucosylgruppenakzeptoren wirken, an denen das Enzym eine α -1,4-Glucankettenverlängerung katalysiert.

Bei einer solchen Kettenverlängerung entstehen auch aus verzweigten Polysacchariden wasserunlösliche lineare Polysaccharide im Sinne der vorliegenden Erfindung, da der Verzweigungsgrad des Glucosylgruppenakzeptors mit zunehmender Kettenverlängerung, also zunehmendem Polymerisationsgrad stark abnimmt. Zu diesem Zweck wird die Saccharose in großem molaren Überschuß zum Akzeptor eingesetzt. Auf diese Weise lassen sich α -1,4-D-Glukane mit einem Molekulargewicht im Bereich von $0,75 \times 10^2$ g/mol bis 10^7 g/mol herstellen. Die linearen oligomeren oder polymeren Akzeptoren können dabei entweder von außen zugesetzt werden, sie können jedoch auch durch die Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt werden.

In einer besonderen Ausführungsform werden die wasserunlöslichen linearen Polysaccharide in Form von Mikropartikeln verwendet, wobei die Mikropartikel ganz oder teilweise aus diesen Polysacchariden bestehen können.

Die Form der Mikropartikel ist nicht sehr kritisch, zweckmäßig werden die Mikropartikel jedoch in sphärischer Form eingesetzt. Unter sphärischen Mikropartikeln werden hierbei annähernd kugelförmige Mikropartikel verstanden, deren Abweichung in den Achsenlängen vom Idealzustand einer Kugel, die durch von einem gemeinsamen Ursprung ausgehende, in den Raum gerichtete Achsen gleicher Länge, die den Radius der Kugel in allen Raumrichtungen definieren, beschrieben wird, nicht mehr als 40% beträgt. Bevorzugt werden sphärische Mikropartikel mit Abweichungen von nicht mehr als 25%, besonders bevorzugt nicht mehr als 15% verwendet.

10

Der mittlere Durchmesser (Zahlenmittelwert) der Mikropartikel liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 nm bis 100 µm, bevorzugt von 100 nm bis 10 µm und besonders bevorzugt von 1 µm bis 5 µm.

- 5 Die spezifische Oberfläche der Mikropartikel liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 m²/g bis 100 m²/g, bevorzugt von 1,5 m²/g bis 20 m²/g und besonders bevorzugt von 3 m²/g bis 10 m²/g.

- 10 Die Dispersität $D = d_w/d_n$ der Mikropartikel, worin d_w den Gewichtsmittelwert des Durchmessers und d_n den Zahlenmittelwert des Durchmessers der Mikropartikel bedeutet, liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 bis 10, vorzugsweise von 1,5 bis 5 und bevorzugt von 2 bis 3. Die Mittelwerte d_w und d_n sind definiert als
- $$d_n = \sum n_i \times d_i / \sum n_i; \text{ und}$$
- $$d_w = \sum n_i \times d_i^2 / \sum n_i \times d_i$$

15

worin

- d_i den Durchmesser der Partikel der Spezies i bedeutet;
 n_i die Anzahl der Partikel i mit dem Durchmesser d_i ; und
20 i einen fortlaufenden Parameter bedeutet.

- 25 Der Begriff Gewicht steht in diesem Zusammenhang nicht für Masse sondern für ein gewichtetes Mittel, wodurch die größeren Durchmesser einen höheren Stellenwert erhalten. Durch den Exponenten 2 werden Durchmesser größerer Partikel stärker gewichtet.

- Vorteilhafte Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäß verwendeten Mikropartikel werden in den älteren deutschen Patentanmeldungen 19737481.6, 19839214.1-44, 19839216.8-44 und 19839212.5-43 beschrieben, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird und deren Offenbarung ebenfalls Bestandteil
30 der vorliegenden Beschreibung bildet.

Zweckmäßig sind die bevorzugt sphärischen Mikropartikel erhältlich durch Lösen der wasserunlöslichen linearen Polysaccharide in einem geeigneten Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Formamid, Acetamid, oder N,N-Dimethylformamid, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel, vorzugsweise Wasser, Kühlen des dabei entstehenden Gemisches auf vorzugsweise 10°C bis -10°C und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel.

Struktur und Oberfläche der Mikropartikel können durch die Art des Fällmittels, beispielsweise durch ganz oder teilweisen Ersatz von Wasser durch Dichlormethan, gesteuert werden. Durch die Mitverwendung geeigneter Zusatzstoffe, beispielsweise anionische, kationische oder nichtionische oberflächenaktive Substanzen wie Natriumdodecylsulfat, N-Methylgluconamid, Polysorbate wie sie unter dem handelsnamen Tween® erhältlich sind, Fettsäureglycolester, Alkylpolyglycolether, Alkylpolyglycolethersulfate, Ethylenoxid-Propylenoxid-Blockpolymere wie Pluronic®, Alkylsulfate und Zucker wie Fructose, Saccharose und Glucose, kann ebenfalls Einfluß auf Struktur, Größe und Oberfläche der Partikel genommen werden.

Die Konzentration des Polysaccharids in der Lösung kann in einem weiten Bereich variieren und beträgt vorzugsweise zwischen 0,1 g Polysaccharid pro ml Lösungsmittel.

Mikropartikel mit besonders glatter Oberfläche lassen sich erhalten, wenn dem Fällungsmittel wasserlösliche Cellulosederivate, beispielsweise Celluloseester oder Celluloseether wie Hydroxypropylmethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Carboxymethylcellulose, Cellulose-acetat, Cellulosebutyrat oder Cellulosenitrat zugesetzt werden.

Mikropartikel mit einer mittleren Größe von 0,1 µm bis 3 µm lassen sich bei diesem Verfahren vorteilhaft erhalten, wenn man dem Fällmittel ein heißwasserlösliches α-D-Glucan zusetzt.

Die Porosität der Mikropartikel läßt sich auch durch die Wahl des wasserunlöslichen linearen Polysaccharids oder des Verfahrens zu seiner Herstellung steuern. So kann

beispielsweise der Zusatz von Hilfsstoffen bei der biotechnologischen Herstellung der Polysaccharide die Porosität der aus solchen Polysacchariden erhaltenen Mikropartikel beeinflussen. Insbesondere wurde gefunden, daß die Porosität von Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus wasserunlöslichen linearen α -1,4-Glucanen bestehen, erhöht werden kann, wenn die Herstellung des Glucans aus Saccharose mittels Amylosucrase in Gegenwart eines Glucosylgruppenakzeptors, beispielsweise Dextrin oder Glykogen, erfolgt. Dabei werden die Mikropartikel umso poröser, je höher die Konzentration des Glucosylgruppenakzeptors bei der Biotransformation ist.

Die Mikropartikel können chemisch vernetzt oder unvernetzt sein. Um den Einfluß störender Fremdchemikalien, die bei der Vernetzung eingeschleppt werden können, zu vermeiden, werden unvernetzte Mikropartikel bevorzugt.

Die erfindungsgemäßen Filtermittel können ganz oder teilweise aus wasserunlöslichen linearen Polysacchariden bestehen. In einer vorteilhaften einfachen Ausführungsform besteht das Filtermittel vollständig aus wasserunlöslichen linearen Polysacchariden und gegebenenfalls weiteren Hilfs- und Zusatzstoffen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Filtermittel aus den wasserunlöslichen linearen Polysacchariden kann in an sich bekannter Weise durch Bildung von losen oder verfestigten Schichten verschiedener Dicke erfolgen, die ganz oder teilweise aus wasserunlöslichen linearen Polysacchariden bestehen.

Verfestigte Schichten lassen sich beispielsweise durch Pressen der Polysaccharide herstellen.

Verfahren zur Herstellung von verfestigten Filtermitteln und von Filtervorrichtungen sind auch in der EP-A-826 412 und der WO 98/08594 beschrieben, auf deren Offenbarung hier ausdrücklich Bezug genommen wird.

In einer einfachen und zweckmäßigen Ausführungsform erfolgt die Herstellung der erfindungsgemäßen Filtermittel dadurch, daß man die wasserunlöslichen linearen

13

Polysaccharide zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel oder Suspensionsmittel löst bzw. suspendiert und anschließend in einer für das Filtermittel oder die Filtervorrichtung geeigneten porösen Form verfestigt.

5 Geeignete Lösungsmittel sind solche, wie sie auch bei der Herstellung der Mikropartikel verwendet werden, also DMSO, Formamid, Acetamid, oder N,N-Dimethylformamid. Die Verfestigung aus solchen Lösung kann beispielsweise durch Entfernen des Lösungsmittels erfolgen, beispielsweise durch Verdampfen des Lösungsmittel durch Erwärmen oder im Vakuum, oder die Polysaccharide werden
10 durch Zugabe eines Fällmittels, das sich vorzugsweise anschließend ebenfalls leicht entfernen läßt, beispielsweise Wasser, präzipitiert.

Bevorzugt liegen die erfindungsgemäß eingesetzten Polysaccharide, gegebenenfalls in Form von Mikropartikeln, in Suspension vor.

15

Als Suspensionsmittel sind beispielsweise Wasser und Alkohole geeignet. Die Verfestigung kann wiederum durch Verdampfen des Suspensionsmittels, beispielsweise durch Erwärmen oder im Vakuum erfolgen.

20 Geeignete Lösungs- und Suspensionsmittel können auch Hydrokolloide und Polymerlösungen einschließlich Harzlösungen sein, die zusammen mit den erfindungsgemäßen Polysacchariden verfestigt werden und diese in einer Matrix einbetten. Geeignete Polymere sind beispielsweise Vinylester, Polyamide und Poly(meth)acrylate. Bei der Verfestigung ist insbesondere darauf zu achten, daß
25 eine poröse Schicht gebildet wird und die die Filtereigenschaften tragenden wasserunlöslichen linearen Polysaccharide oder die Mikropartikel daraus für die abzutrennenden Stoffe zugänglich sind. Derartige Verfahren sind in der EP-A-826 412 und der WO 98/08594 ausführlich beschrieben.

Neben den wasserunlöslichen linearen Polysacchariden können die
30 erfindungsgemäßen Filtermittel auch noch andere Materialien enthalten, die die Eigenschaften des Filtermittels verändern, beispielsweise Mikropartikel aus Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, Glas, Graphit, Calciumphosphat oder Zinkpolyphosphat, oder andere Hilfs- und Zusatzstoffe. Vorzugsweise werden solche

Substanzen verwendet, die mit den Polysacchariden keine chemische Reaktion und keine kovalente Bindung eingehen.

Die erfindungsgemäßen Filtermittel können in Filtervorrichtungen verschiedenster Art zur Abtrennung von Stoffen aus Flüssigkeiten oder Gasen verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Filtermittel in den Filtervorrichtungen zusammen mit wenigstens einem weiteren porösen Element verwendet, das in Flußrichtung der zu behandelnden Flüssigkeit oder des zu behandelnden Gases unter und/oder über dem erfindungsgemäßen Filtermittel liegen kann und auf diese Weise beispielsweise als Stütz- Träger-, Fixier oder Deckschicht für das erfindungsgemäße Filtermittel dienen kann oder auch als zusätzliches Filtermittel fungiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Filtermittel zwischen zwei solchen Elementen in der Filtervorrichtung fixiert.

Das Filtermittel steht mit dem wenigstens einen porösen Element zweckmäßig in direktem Kontakt und kann an dieses kovalent oder nicht-kovalent gebunden sein.

Die porösen, vorzugsweise mikroporösen Elemente können beispielsweise in Form von Scheiben, Platten, Gittern oder Netzen, beispielsweise Fritten, vorliegen. Sie können aus den verschiedensten Materialien gebildet sein und beispielsweise aus festen miteinander verbundenen Teilchen bestehen. Geeignete Materialien, aus denen solche porösen Elemente bestehen können, sind beispielsweise Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylacetat, Polyester, Polyamide, Polystyrol und Polycarbonat, Glas, Keramik und Quarz oder Mischungen aus verschiedenen Materialien. Ebenso können die Elemente aus Geweben von natürlichen oder synthetischen und halbsynthetischen Fasern oder aus Metallnetzen bestehen. Besonders bevorzugte sind mikroporöse Elemente wie Glasfilter und mikroporöse Membranen, wie sie beispielsweise aus Celluloseacetat oder anderen Cellulosederivaten, Polyamiden, Polyvinylchlorid, Polysulfonen und Teflon für Mikrofiltrationen hergestellt werden können. Derartige Elemente sind ebenfalls in der EP-A-826 412 und der WO 98/08594 beschrieben. Auch eine einfache Schicht aus Glaswolle kann zusammen mit dem Filtermittel verwendet werden.

Sofern die erfindungsgemäßen Filtermittel zusammen mit einem weiteren porösen Element als Träger- oder Fixierschicht verwendet werden, kann die Verfestigung des Filtermittels direkt auf diesem Element erfolgen.

- 5 Zur Herstellung der Filtervorrichtungen kann das Filtermittel nach seiner Herstellung in ein geeignetes Behältnis eingebracht und dort fixiert werden oder das Filtermittel kann direkt in dem Behältnis an der gewünschten Position gebildet werden. Das Behältnis ist so ausgestaltet, daß es den Durchfluß oder die Passage der Flüssigkeiten oder Gase, die die abzutrennenden Stoffe enthalten, erlaubt.
- 10 Filtervorrichtungen, die das erfindungsgemäße Filtermittel enthalten, können beispielsweise Rundfilter sein, die auf eine Spritze aufgesteckt werden können, mit deren Hilfe dann die Flüssigkeit, die das abzutrennende Material enthält, durch den Filter gedrückt wird. In einer solchen Vorrichtung ist das Filtermittel zweckmäßig auf einer porösen Membran, beispielsweise aus Celluloseacetat, aufgebracht und/oder
- 15 zwischen zwei porösen Membranen fixiert.

- In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform befindet sich das erfindungsgemäße Filtermittel in einem geeigneten Hohlkörper, insbesondere einem zylindrischen Hohlkörper. Ein solcher Hohlkörper kann beispielsweise ein Spritzenkörper sein.
- 20 Vorteilhaft läßt sich die Filtervorrichtung mit einem Proben- oder Zentrifugenröhrchen verbinden, so daß das Filtrat direkt in einem geeigneten Behälter aufgefangen werden kann.

- In einer besonders einfachen und daher vorteilhaften Ausführungsform zur
- 25 Herstellung erfindungsgemäßer Filtervorrichtungen werden die wasserunlöslichen linearen Polysaccharide oder Mikropartikel daraus in Wasser suspendiert, zweckmäßig in einer Menge, daß eine streichfähige Masse entsteht. Diese Masse wird auf ein poröses Element, vorzugsweise eine mikroporöse Membran, aufgebracht und gleichmäßig verteilt. Nach Trocknen und Verfestigung können
- 30 gewünschte Filter ausgestanzt und beispielsweise in ein Zentrifugenröhrchen eingebracht und dort in geeigneter Weise, beispielsweise durch Verkleben oder Verschmelzen befestigt werden.

In einer weiteren Ausführungsform kann die Herstellung des Filtermittels auf einem poröse Element erfolgen, das bereits in einer Filtervorrichtung vorgeformt ist, beispielsweise auf einer in einem Zentrifugenröhrchen befindlichen mikroporösen Membran. Solche Zentrifugenröhrchen werden beispielsweise von der Fa. Schleicher & Schuell unter der Bezeichnung Centrex® vertrieben.

Die Herstellung loser Feststoffschichten erfolgt zweckmäßig durch Aufschütten des trockenen, pulverförmigen oder partikulären Polysaccharids, beispielsweise, durch Aufbringen auf ein poröses Trägerelement oder durch Einschließen des Materials zwischen zwei porösen Fixierelementen.

Die Abtrennung von gelösten, kolloidalen, suspendierten oder gelösten Stoffen aus Flüssigkeiten oder Gasen kann durch Sieb-, Affinitäts- und/oder Adsorptionseffekte des erfindungsgemäßen Filtermittels bzw. der darin verwendeten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Filtervorrichtungen und Filtermittel eignen sich durch diese Eigenschaften sowohl zur Reinigung von Flüssigkeiten oder Gasen von unerwünschten Stoffen als auch zur Abtrennung, Reinigung und Isolierung der in den Flüssigkeiten oder Gasen vorhandenen Stoffe.

Zweckmäßig erfolgt die Abtrennung von Stoffen aus Flüssigkeiten oder Gasen dadurch, daß man die Flüssigkeiten oder Gase unter Bedingungen, unter denen die abzutrennenden Stoffe von dem Filtermittel zurückgehalten werden, durch das Filtermittel strömen läßt.

Der Strom der Flüssigkeiten durch das Filtermittel wird zweckmäßig erleichtert, indem man beispielsweise einen Über- oder Unterdruck an die Filtervorrichtung anlegt. Die Passage durch das Filtermittel kann aber auch durch einen Zentrifugationsschritt erleichtert werden.

Sofern gewünscht können die abgetrennten, vom Filtermittel zurückgehaltenen Stoffe zurückgewonnen werden, entweder mechanisch, wenn sich die abgetrennten

Stoffe auf der äußeren Oberfläche des Filtermittels befinden, oder durch einen Elutionsschritt unter Bedingungen, unter denen die abgetrennten Stoffe vom Filtermittel gelöst werden.

5 So können die erfindungsgemäßen Filtermittel beispielsweise zur Abtrennung und Reinigung von biologischem Material, beispielsweise von Nukleinsäuren, verwendet werden, indem man eine das biologische Material enthaltende Probe unter Bedingungen, unter denen das biologische Material vom Filtermittel zurückgehalten wird, beispielsweise in einem geeigneten Puffer, durch das Filtermittel passieren läßt
10 und dieses Material anschließend, gegebenenfalls nach weiteren Waschschritten, vom Filtermittel eluiert.

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Filtermittel liegt darin, daß sie zur Abtrennung und gegebenenfalls Reinigung einer Vielzahl von Stoffen geeignet sind.
15 Hierzu gehören Wirkstoffe aller Art wie Farbstoffe, Aromen und Duftstoffe, Giftstoffe, beispielsweise im Zigarettenrauch, natürliche und synthetische Polymere und biologisches Material, beispielsweise Nukleinsäuren wie einzel- und doppelsträngige lineare DNA, Plasmid-DNA und RNA, Proteine wie Enzyme und Antikörper oder Komplexe von Nukleinsäuren und Proteinen, beispielsweise mit Nukleinsäure- oder
20 Protein-bindenden Substanzen.

Die erfindungsgemäßen Filtervorrichtungen und Filtermittel eignen sich sowohl für präparative und analytische Mikrofiltrationen im Labormaßstab, wobei sich auch aus kleinen Probenvolumina geringe Mengen wertvoller Substanzen weitgehend ohne
25 Verluste und ohne Verunreinigungen gewinnen lassen, als auch für Fest-Flüssig-Trennungen in größerem Maßstab, beispielsweise zum Klären von Flüssigkeiten, zum Ernten von Zellen oder zur Abtrennung von Zelltrümmern. Die Filtermittel lassen sich ferner einfach und schnell handhaben, sind gegen eine Vielzahl von Lösungsmitteln beständig und sind wegen ihrer biologischen Abbaubarkeit auch
30 umweltverträglich zu entsorgen.

Die erfindungsgemäß verwendeten wasserunlöslichen linearen Polysaccharide besitzen ein hohes Adsorptions- und Retentionsvermögen, das im wesentlichen unabhängig von der Größe und der chemischen und biologischen Struktur der

abzufiltrierenden Substanz ist. Die Filtermittel können einfach und rasch hergestellt werden. Insbesondere kann die Herstellung durch den Benutzer entsprechend den jeweiligen Anforderungen selbst und in kleinen Mengen erfolgen, so daß nicht auf vorkonfektionierte Filter zurückgegriffen werden muß. Die Eigenschaften der Filtermittel lassen sich außerdem in einem weiten Bereich variieren und auf individuelle Bedürfnisse abstellen, beispielsweise durch Veränderung der Porosität der Filtermittel, beispielsweise durch Variation der verwendeten Polysaccharid-Mikropartikel, oder durch Zusatz weiterer Stoffe. Dies ist vor allem in der wissenschaftlichen Forschung von großer Bedeutung.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Abbildungen und Beispielen näher erläutert.

Fig. 1 zeigt eine besondere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Filtervorrichtung und zwar eine Filtervorrichtung 1, die ein Behältnis 2 in Form eines zylindrischen Hohlkörpers aufweist, der das Filtermittel 3 enthält, beispielsweise in Form von Mikropartikeln. Das Filtermittel ist zwischen zwei porösen Elementen 4 und 5 fixiert. Die Vorrichtung weist außerdem eine Einlaßöffnung 6 zur Aufnahme von Flüssigkeit und einen Auslauf 7 für das Filtrat auf.

Fig. 2 zeigt die Analyse (Detektion mit Ethidiumbromid 0,5 pg/ml bei 256 nm gemäß Beispiel 9, beachte Legende) einer Plasmid-DNA enthaltenden Flüssigkeit nach Passage durch ein erfindungsgemäßes Filter auf einem Agarosegel; und zwar

Von links nach rechts:

- Spur 1: Marker (Boehringer Mannheim DNA Molecular Weight Marker X)
- Spur 2: Filter 2 ohne Filtermittel (Blindreferenz)
- Spur 3: Filter 2 gefüllt mit erfindungsgemäßen Filtermittel
- Spur 4: Filter 1: Kartusche Qiagen® mit erfindungsgemäßen Filtermittel
- Spur 5: Filter 1: Qiagen® Midipräp (Hilden, Deutschland) Referenz
- Spur 6: Filter 2 mit Filtermittel
- Spur 7: reine DNA-Plasmidlösung (handelsübliches Plasmid pBluescript II SK)

Fig. 3 zeigt die Analyse (Detektion mit Ethidiumbromid 0,5 pg/ml bei 256 nm gemäß Beispiel 9, beachte Legende) der Eluate der gebundenen Plasmid-DNA von den erfindungsgemäße Filtern mit einem geeigneten Puffer auf einem Agarosegel; und zwar

5

Von links nach rechts:

- Spur 1: Marker (Boehringer Mannheim DNA Molecular Weight Marker X)
- Spur 2: Filter 2 ohne Filtermittel (Blindreferenz)
- Spur 3: Filter 2 gefüllt mit erfindungsgemäßen Filtermittel
- 10 Spur 4: Filter 1: Kartusche Qiagen® mit erfindungsgemäßen Filtermittel
- Spur 5: Filter 1: Qiagen® Midipräp (Hilden, Deutschland) Referenz
- Spur 6: Filter 2 mit Filtermittel
- Spur 7: reine DNA-Plasmidlösung (handelsübliches Plasmid pBluescript II SK)

15

Beispiele

Beispiel 1

20

Herstellung von wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen

25

a) 15 l einer 20%igen Saccharose-Lösung wurden in ein steriles 25 l-Gefäß gegeben. Hierzu wurden 120 ml eines Amylosucrase enthaltenden Enzymextrakts aus einem mit dem Gen für Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* transformierten Produktionsstamm gegeben. Die Enzymaktivität betrug 20 Units (1 Unit = 1 μ mol Saccharose \times min⁻¹ \times mg Enzym). Die Biotransformation wurde in Abwesenheit von Glucosylgruppenakzeptoren durchgeführt.

30

Die Apparatur wurde mit einem sterilen KPG-Rührer versehen und verschlossen und es wurde bei 39°C gerührt. Bereits nach wenigen Stunden hatte sich ein weißer Niederschlag gebildet. Die Reaktion war nach 59 Stunden beendet. Der Niederschlag wurde abfiltriert und zur Abtrennung niedermolekularer Zucker zweimal mit Wasser gewaschen. Der im Filter verbliebene Rückstand wurde bei 38°C im

Trockenschrank unter Vakuum getrocknet Die erhaltene Masse an α -1,4-D-Glucan betrug 893 g, entsprechend einer Ausbeute von 59% Das Molekulargewicht (gemessen mittels Gelpermeations-chromatographie (GPC), Lösungsmittel DMSO; Eichung mit Pullulanstandards) betrug $M_W = 9000$ g/mol; $M_n = 4400$ g/mol; $M_W/M_n = 2,05$ (Glucan 1a).

b) Die Biotransformation wurde wie unter Beispiel 1a beschrieben durchgeführt, es wurden jedoch 0,1% Dextrin (w/v) als Glucosylgruppenakzeptor zugefügt (Glucan 1b).

Beispiel 2

Herstellung von Mikropartikeln aus α -1,4-D-Glucanen

a) 200 g des nach Beispiel 1a) erhaltenen α -1,4-D-Glucans (Glucan 1a) wurden in 1 l Dimethylsulfoxid (DMSO; Riedel-de-Haen) bei 50°C gelöst. Anschließend wurde die Lösung langsam in 8 l bidestilliertes Wasser getropft. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Es bildete sich eine feine Suspension von Mikropartikeln, die durch Dekantieren abgetrennt wurde. Der Bodensatz wurde aufgeschlämmt und 5 min bei 5000 UpM in einer Ultrazentrifuge (Typ RC5C) zentrifugiert. Der feste Rückstand wurde dreimal mit bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die Feststoffe wurden gesammelt und die noch feuchte Suspension gefriergetrocknet (Christ Delta 1-24 KD). Es wurden 176 g weißer Feststoff isoliert (Ausbeute 88%). Die so erhaltenen Mikropartikel sind sphärischer Gestalt und die Partikeldurchmesser liegen mehrheitlich zwischen 2 und 3 μ m, wie bestimmt durch Rasterelektronen-mikroskopie (REM; Camscan S-4).

Die spezifische Oberfläche wurde mit einem Sorptomatic 1990 (Fisons Instruments) unter Verwendung der "default method sorptomatic"-Einstellung bestimmt. Für die Untersuchung wurden die Proben bei 80°C im Vakuum über Nacht getrocknet, wobei das erhaltene α -1,4-D-Glucan zuvor mit einer handelsüblichen Mühle (Waring®) gemahlen wurde, so daß die durchschnittliche Größe der Partikel weniger als 200 μ m betrug. Die spezifische Oberfläche betrug 4,5 m²/g (Mikropartikel 2a).

- b) Die Herstellung der Mikropartikel wurde wie in Beispiel a) durchgeführt, jedoch wurde das nach Beispiel 1b) erhaltene α -1,4-D-Glucan (Glucan 1b) eingesetzt. Die spezifische Oberfläche betrug 2,9 m²/g (Mikropartikel 2b).

5

Beispiel 3

Filtration eines Farbstoffs mit einem α -1,4-D-Glucan

- 10 200 mg der nach den Beispielen 2a und 2b erhaltenen Mikropartikel wurden in ein Zentrifugengefäß mit einer mikroporösen Membran (Schleicher & Schuell, Centrex MF-5,0, 0,45 μ m, Deutschland) eingewogen. Anschließend wurden 3 ml einer 0,04%igen Brilliantblau-Lösung in entionisiertem Wasser hinzugefügt. Das Gefäß wurde verschlossen und dann wurden die Partikel geschüttelt und aufgeschlämmt.
- 15 Die Suspension wurde für 1 Minute sich selbst überlassen. Anschließend wurde bei 3000 U/min zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus). Eine visuelle Auswertung ergab eine verminderte bis nicht mehr vorhandene Färbung. Die Mikropartikel waren deutlich blau gefärbt.
- 20 Die durchgespülte Flüssigkeit, das Filtrat, wurde in eine Quarzküvette gefüllt und am UV-Vis-Spektrometer (Fa. Beckmann, UV-DU 640, Deutschland) vermessen. Es wird beim Absorptionsmaximum von Brilliantblau gemessen (λ_{max} = 552 nm). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Glucan	Mikro-partikel	Oberfläche (m ² /g)	REM	Extinktion
- (0,04%ige Ausgangslösung)	-	-	-	2,0487
Glucan 1a	2a	4,53	1-3 µm Partikeldurchmesser; sphärisch bis kugelförmig	0,0251
Glucan 1b	2b	2,90	Zusammenhängende Morphologie, ansatzweise Partikel, zerklüftet watteartig	0,1228

- 5 REM Rasterelektronenmikroskopie
 Glucan 1a: α-1,4-D-Glucan aus Beispiel 1a)
 Glucan 1b: α-1,4-D-Glucan aus Beispiel 1b)
 Mikropartikel 2a: Mikropartikel aus Beispiel 2a)
 Mikropartikel 2b: Mikropartikel aus Beispiel 2b)

Beispiel 4 (Vergleichsbeispiel)

Filtration eines Farbstoffs mit verschiedenen Stärken

- 5 Zum Vergleich mit den erfindungsgemäßen wasserunlöslichen α -1,4-D-Glucanen wurden die Versuche der Beispiele 2 und 3 mit verschiedenen im Handel erhältlichen natürlichen Stärken aus Kartoffel und Mais mit unterschiedlichen Verhältnissen von Amylose zu Amylopektin durchgeführt.
- 10 Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Glucan	Mikro-partikel	Oberfläche (m ² /g)	REM	Extinktion
- (0,04%ige Ausgangslösung)	-	-	-	2,0487
Toffena*1	keine	1,28	natürliche Kornstruktur (ca. 20-100 µm); glatte Oberfläche	1,6535
Hylon VII*2	keine	2,12	natürliche Kornstruktur (ca. 20-100 µm); glatte Oberfläche	0,2689
Amylose*3	-	1,54	Eine Untersuchung konnte aufgrund der Löslichkeit in Wasser nicht vorgenommen werden.	

24

*1 Kartoffelstärke der Fa. Südstärke, Deutschland (ca. 17% Amyloseanteil)

*2 Maisstärke der Fa. National Starch, USA (ca. 60 bis 70% Amyloseanteil)

*3 aus Kartoffelstärke gewonnene Amylose der Fa. Merck AG (>90% Amyloseanteil).

10 Die Ergebnisse zeigen die Überlegenheit der erfindungsgemäßen wasserunlöslichen linearen Polysacchariden im Vergleich mit wasserlöslichen und verzweigten Polysacchariden.

Beispiel 5

15

Herstellung von Filtern zur Filtration von Lebensmittelfarbstoffen

Zur Herstellung eines Filters zur Filtration von Lebensmittelfarbstoffen wurde ein Metallfilter (Fa. Millipore, Micro-Syringe 25mm Filter Holder; USA) präpariert. Hierzu wurde ein 0,5 µm Filter (Millipore, Filter Type FH, FHLC 047 00; USA) auf einem Dichtungsring befestigt. Die Höhe des Dichtungsringes betrug ca. 2 mm. Die Mikropartikel (80 mg) wurden mit wenig Wasser so befeuchtet, daß gerade eine streichfähige Masse entstand. Die befeuchteten Mikropartikel wurden in den vorbereiteten Filterhalter gelegt. Darüber wurde ein feines Metallsieb gelegt. Diese Anordnung wurde mit dem oberen Teil des Metallfilters fest verschlossen. Der so präparierte Metallfilter wurde auf einer Einmalspritze (Fa. Beckton Dickinson) fixiert. Dann wurden 4 ml einer 0,05%igen Lösung eines Lebensmittelfarbstoffs (Annatto W.S. 14% der Fa. ProAndina Rohstoffe GmbH) in entionisiertem Wasser in die Spritze gegeben und durch den Filter gedrückt. Die Partikel sind optisch erkennbar gefärbt. Der Farbstoff läßt sich mit frischem entionisiertem Wasser nicht aus den Partikeln herauswaschen. Die Lösung ist gelblich.

Beispiel 6**Bestimmung des Rückhaltevermögens von verschiedenen α -1,4-D-Glucanen**

- 5 Zur Bestimmung des Rückhaltevermögens verschiedener α -1,4-D-Glucane für den Farbstoff Brilliantblau wurden die entsprechend den Beispielen 3 und 4 erhaltenen gefärbten Mikropartikel verschiedener Glucane wie in Beispiel 3 beschrieben in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 3 ml entionisiertem Wasser versetzt. Die Suspensionen wurden 1 Minute stehengelassen. Anschließend wurde bei
- 10 3000 U/min zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus).

Das erhaltene Filtrat war klar.

- Die Farbe der gewaschenen Mikropartikel wurde optisch beurteilt und das Filtrat
- 15 spektroskopisch vermessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt

Die Mengenbilanzen der Filtrationen, das Rückhaltevermögen (%) und der irreversible Anteil (%) sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3

Glucan	Extinktion 1. Filtrat	Extinktion 2. Filtrat	optische Beurteilung der Mikro- partikel (Aufsicht)	Optische Beur- teilung der Mikro- partikel (Seiten- ansicht)
- (0,04%ige Ausgangs- lösung)	2,0487	-	-	-
Glucan 1a	0,0251	0,0062	Intensiv violett	Homogen durchfärbter Filterkuchen
Glucan 1b	0,1228	0,1059	Intensiv violett	ca. 80% homogen durchfärbter Filterkuchen
Toffena	1,6535	0,0357	Weiß	Nahezu weißer Filter- kuchen
Hylon VII	0,2689	0,3086	blau	Keine homogene Verfärbung des Filter- kuchens

Tabelle 4

Mengenbilanz der Filtrationen, prozentuales Rückhaltevermögen und irreversibler Anteil in Prozent

5

Glucan	adsorbierte Menge im Filterkuchen (µg)	durchgespülte Menge (µg)	Rückhaltevermögen (%)	Menge in der Waschlösung (µg)	Reversibler Anteil (%)
- (0,04%ige Ausgangslösung)	-	120 µg	-	-	-
Glucan 1a	118,5 µg	1,5 µg	98,8	0,4 µg	0,34
Glucan 1b	112,8 µg	7,2 µg	94,0	6,2 µg	5,50
Toffena	23,1 µg	96,9 µg	19,3	2,3 µg	10,9
Hylon VII	104,3 µg	15,7 µg	86,9	18,1 µg	17,35

Beispiel 7

10 Filtration eines Farbstoffs mit α -1,4-D-Glucan und Vergleichssubstanzen in Abhängigkeit von der Zeit

Die Durchführung erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben mit Brilliantblau. Es wurde jedoch die Zeitabhängigkeit untersucht. Hierzu wurden die Mikropartikel-

15 Suspensionen mit dem Farbstoff einmal 1 Minute und einmal 2 Minuten stehen gelassen, bevor die Lösung zentrifugiert wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Zeitabhängigkeit der Filtration von Farbstoffen mit α -1,4-D-Glucanen

Glucan	Extinktion Filtrat nach 1 Minute	Extinktion Filtrat nach 2 Minuten	Prozentuale Verbesserung bei doppelter Zeit
- (0,04%ige Ausgangs- lösung)	2,0487	2,0487	0
Glucan 1a	0,0251	0,0102	59,4
Glucan 1b	0,1228	0,1218	0,81
Toffena	1,6535	1,6207	2,0
Hylon VII	0,2689	0,2353	12,5

5

Beispiel 8

Herstellung der Filtervorrichtungen

10

Zur Abtrennung von biologischem Material (Nukleinsäuren u.a.) aus Flüssigkeiten wurden verschiedene Filtervorrichtungen entsprechend Fig. 1 hergestellt.

15

Als eine erste Ausführungsform wurde eine Filtervorrichtung 1 mit einem zylindrischen Hohlkörper 2 aus Polyethylen hergestellt, der einen Durchmesser von 1,5 cm aufwies. Der Auslauf 7 besaß einen Durchmesser von 2-3 mm. Am unteren Ende des Hohlkörpers 2 vor dem Auslauf 7 befand sich ein Glasfilter als poröses Element 5, auf das 580 mg eines wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucans (gemäß Beispielen 2a und 2b) als Filtermittel 3 aufgebracht waren. Das Filtermittel 3 wurde mit einem weiteren Glasfilter als porösem Element 4 abgedeckt. Auf diese Weise wurde Filter 1 (vgl. Fig. 1) erhalten.

20

Eine weitere Ausführungsform wurde wie Filter 1 ausgestaltet mit der Ausnahme, daß als poröses Element 5 ein Cellulosefilter und als poröses Element 4 eine Schicht Glaswolle verwendet wurde. Auf diese Weise wurde Filter 2 erhalten.

5 Beispiel 9

Abtrennung von Nukleinsäure

10 Abtrennung oder Rückhaltung von Stoffen, Verwendung des Filtermittels zur
Abtrennung von biologischem Material, insbesondere Nukleinsäure

Einwegzentrifugenfilter (Firma Schleicher & Schüll, z.B. Centrex, Katalognummer 467012 (April 1996): "Filter 1" in Fig. 2 und Fig. 3) werden unter Einsatz von 580 mg der hergestellten Mikropartikel gemäß Beispiel 2a und 2b als Filtermittel mit 3 ml einer Puffer 1 (siehe unten) Lösung equilibriert. (ggf. Zentrifuge (2000 U/min)).
15 Anschließend werden 2 ml einer wässrigen DNA-Plasmidlösung (verwendetes Plasmid: pBluescript II SK) mit der Konzentration 50 µg/ml auf den Filter gegeben (ggf. Zentrifuge (5min bei 2000 U/min)). Es erfolgt ein Referenzlauf mit ("Filter 2" in Fig. 2 und 3) Qiagen® Midipräp (Hilden, Deutschland) und ein weiterer Referenzlauf mit Qiagen® Midipräp - Kartuschen ohne Qiagen® Filtermittel, welche mit dem
20 erfindungsgemäßen Filtermittel bestückt wurden.

Jeweils 5 µl Eluat, wird mit etwa 1/10 der Konzentration mit Anfärbereagenz (Marker) versehen und auf eine Agarosegelplatte (60% Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau) aufgetragen mit anschließender Gelelektrophorese (Firma Biorad,
25 Power Supply, Modell 100/200). Als Referenz zur Abschätzung und Einordnung detektierter Plasmide wird ein Marker (MG 5.000) in Spur 1 und die verwendete DNA-Plasmidlösung als Referenz aufgetragen. Fig. 2 zeigt, daß am erfindungsgemäßen Filtermittel die Proben - DNA zurückgehalten wurde.

30 Anschließend werden 5ml eines zweiten Puffers (Puffer 2) auf die Säule (Filter) zum Eluieren gegeben und schnell durch Zentrifugation aufgearbeitet (5min bei 2000 U/min).

Die Eluate (Referenzen wie vorgenannt) werden auf eine Agarosegelplatte (60% Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau) aufgetragen und

30

anschließend eine Gelelektrophorese (Firma Biorad, Power Supply, Modell 100/200) durchgeführt (siehe Fig. 3). Als Vergleich wurde ein Marker (MG 5.000) (Spur 1) und die DNA-Plasmidlösung (Spur 7) aufgetragen.

5 Pufferbeschreibung:

Puffer 1: 750 mM NaCl
 50 mM MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid, pKa 7.2)
 15% Isopropanol
10 0,15% Triton® X-100

Puffer 2: 1,25 M NaCl
 50 mM Tris, Tris*Clm, Ph 8,5
 15% Isopropanol

15

Die Ergebnisse, die in Fig. 3 dargestellt sind, zeigen, daß sich die Plasmid-DNA problemlos vom Filtermittel eluieren läßt. Der Vergleich mit den handelsüblichen Filtermaterialien zeigt, daß das erfindungsgemäße Filtermittel auf Basis von wasserunlöslichen linearen α -1,4-D-Glucanen mindestens die gleiche Qualität wie

20 die bereits bekannten Filtermittel besitzen.

Patentansprüche

1. Filtermittel, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens ein wasserunlösliches lineares Polysaccharid umfaßt.
2. Filtermittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das wenigstens eine wasserunlösliche lineare Polysaccharid ausgewählt ist aus α -1,4-D-Glucanen und β -1,3-D-Glucanen.
3. Filtermittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan eine Amylose ist.
4. Filtermittel nach einem der Ansprüche 2 oder 3, worin das wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan erhältlich ist durch in-vitro Polymerisation von Glucose unter Einwirkung eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität.
5. Filtermittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserunlösliche lineare Polysaccharid in Form von Mikropartikeln vorliegt.
6. Filtermittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel sphärisch sind.
7. Filtermittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel einen mittleren Durchmesser von 1 μ m bis 5 μ m besitzen.
8. Filtermittel nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel eine spezifische Oberfläche von 3 m²/g bis 10 m²/g besitzen.
9. Filtermittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Filtermittel mikroporös ist.
10. Filtermittel nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel durch Lösen der wasserunlöslichen linearen Polysaccharide in

einem Lösungsmittel, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel und Kühlen des dabei entstehenden Gemisches erhältlich sind.

- 5 11. Filtermittel nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das wasserunlösliche lineare Polysaccharid in eine poröse Matrix eingebettet ist.
12. Filtermittel nach Anspruch 11, worin die Matrix eine Polymermatrix ist.
13. Filtervorrichtung, enthaltend ein Filtermittel nach einem der Ansprüche 1-12.
- 10 14. Filtervorrichtung nach Anspruch 13, umfassend wenigstens ein weiteres poröses Element.
- 15 15. Filtervorrichtung nach Anspruch 14, worin das poröse Element eine mikroporöse Membran ist.
16. Filtervorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, worin das poröse Element mit dem Filtermittel in direktem Kontakt ist und insbesondere kovalent oder nicht-kovalent an dieses gebunden ist.
- 20 17. Verfahren zur Herstellung eines Filtermittels nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder einer Filtervorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, umfassend die Schritte
 - 25 (a) Lösen oder Suspendieren wenigstens eines wasserunlöslichen linearen Polysaccharids in einem geeigneten Lösungs- bzw. Suspensionsmittel; und
 - (b) Verfestigen der Suspension unter Bildung eines Filtermittels.
- 30 18. Verfahren nach Anspruch 17, worin das wenigstens eine wasserunlösliche lineare Polysaccharid ausgewählt ist aus α -1,4-D-Glucanen und β -1,3-D-Glucanen.

19. Verfahren nach Anspruch 18, worin das wenigstens eine wasserunlösliche lineare α -1,4-D-Glucan eine Amylose ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, worin das wenigstens eine wasserunlösliche lineare Polysaccharid in Form von Mikropartikeln, insbesondere sphärischen Mikropartikeln vorliegt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 20, worin das Suspensionsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasser, Alkoholen, Polymerlösungen und Hydrokolloiden.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 21, worin die Suspension zur Verfestigung auf ein poröses Element aufgebracht wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 22, worin das poröse Element eine mikroporöse Membran ist.
24. Verwendung von wasserunlöslichen linearen Polysacchariden als Filtermittel.
25. Verwendung nach Anspruch 24, worin das wasserunlösliche lineare Polysaccharid ausgewählt ist aus α -1,4-D-Glucanen und β -1,3-D-Glucanen.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 oder 25, worin das wasserunlösliche lineare Polysaccharid in Form von Mikropartikeln, insbesondere sphärischen Mikropartikeln vorliegt.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 26 zur Abtrennung und gegebenenfalls Reinigung und Isolierung von biologischem Material aus Flüssigkeiten.
28. Verwendung nach Anspruch 27, worin das biologische Material eine Nukleinsäure ist.

Fig. 1

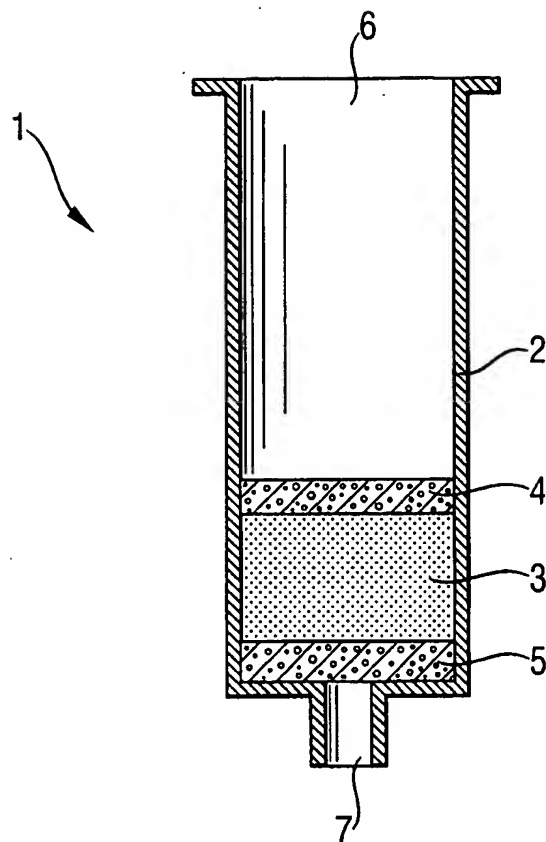


Fig. 2

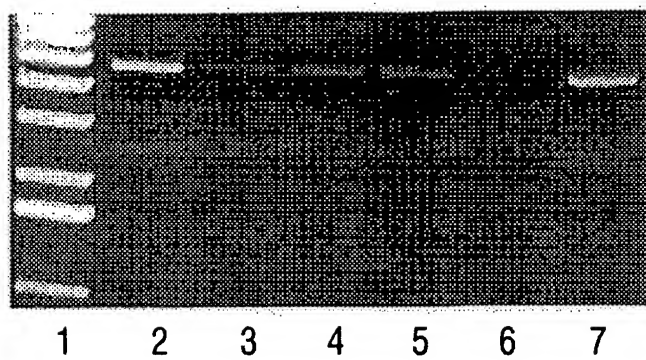
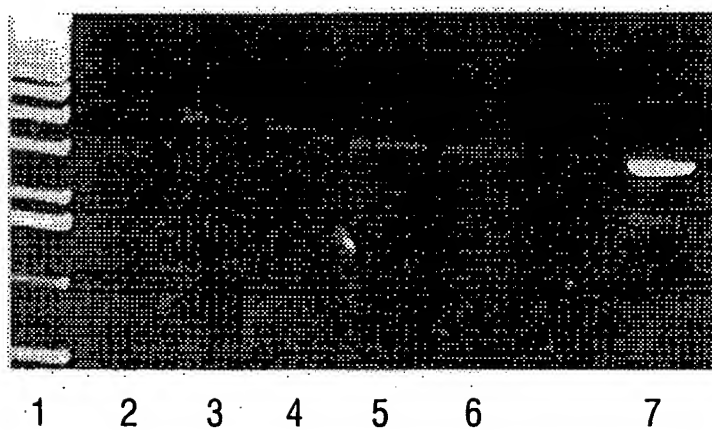


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 99/09288		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01J20/26 B01D61/14 C12N15/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01J C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 11695 A (AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES) 11 March 1999 (1999-03-11) page 9, line 24; claims 1,5,11,14,19	1-7,10, 24-26
X	EP 0 541 356 A (TSURU SUMIAKI) 12 May 1993 (1993-05-12) page 4, line 6 - line 11	1,2,24, 25
X	US 4 143 201 A (YUTAKA MIYASHIRO) 6 March 1979 (1979-03-06) column 1, line 4 - line 5 column 1, line 48	1,2,24, 25
X	WO 95 31553 A (INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 23 November 1995 (1995-11-23) page 2, line 5 - line 14	1-4,24, 25
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
8 March 2000	23/03/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hilgenga, K	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No
PCT/EP 99/09288

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 158 884 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES) 23 October 1985 (1985-10-23) page 9, line 1 - line 5; claims 1,3,4	1,2,11, 12,24,25
X	US 5 281 338 A (HARRIS RALPH ET AL) 25 January 1994 (1994-01-25) column 2, line 25 - line 28	1,24
X	US 5 155 144 A (J.L. MANGANARO) 13 October 1992 (1992-10-13) column 2, line 51 - line 59 column 3, line 3 - line 10	1,5, 11-13, 24,26-28
A	WO 98 08594 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 5 March 1998 (1998-03-05) cited in the application claims 1-3,9-11,45,46,48,65	13-17, 21-23
A	EP 0 885 644 A (NGK INSULATORS) 23 December 1998 (1998-12-23) column 1, line 54 -column 2, line 2; claims 1,2	1,24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Serial Application No

PCT/EP 99/09288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911695 A	11-03-1999	DE 19737481 A AU 9532798 A	04-03-1999 22-03-1999
EP 541356 A	12-05-1993	JP 2032301 C JP 5123511 A JP 7049087 B DE 69204255 D DE 69204255 T KR 9702182 B US 5352418 A	19-03-1996 21-05-1993 31-05-1995 28-09-1995 14-03-1996 25-02-1997 04-10-1994
US 4143201 A	06-03-1979	JP 1310904 C JP 52142789 A JP 60035110 B JP 1216923 C JP 52050352 A JP 58050256 B DE 2646879 A DK 470676 A FR 2328732 A GB 1577955 A NL 7611565 A SE 427932 B SE 7611646 A US 4493894 A BE 847467 A	11-04-1986 28-11-1977 13-08-1985 17-07-1984 22-04-1977 09-11-1983 05-05-1977 22-04-1977 20-05-1977 29-10-1980 25-04-1977 24-05-1983 22-04-1977 15-01-1985 20-04-1977
WO 9531553 A	23-11-1995	DE 4417879 A DE 4447388 A AU 699552 B AU 2614195 A CA 2190149 A EP 0759993 A HU 76087 A JP 10500297 T	23-11-1995 27-06-1996 10-12-1998 05-12-1995 23-11-1995 05-03-1997 30-06-1997 13-01-1998
EP 158884 A	23-10-1985	JP 1787407 C JP 4075214 B JP 60226830 A US 4830752 A US 4897198 A US 5002669 A US 5059328 A	10-09-1993 30-11-1992 12-11-1985 16-05-1989 30-01-1990 26-03-1991 22-10-1991
US 5281338 A	25-01-1994	AT 122025 T CA 2089168 A DE 69109485 D DE 69109485 T EP 0542859 A WO 9202460 A GB 2263695 A, B	15-05-1995 11-02-1992 08-06-1995 18-01-1996 26-05-1993 20-02-1992 04-08-1993
US 5155144 A	13-10-1992	AU 8853991 A WO 9207640 A	26-05-1992 14-05-1992
WO 9808594 A	05-03-1998	EP 0826413 A EP 0826412 A AU 4455797 A	04-03-1998 04-03-1998 19-03-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/09288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9808594 A		EP 0958035 A	24-11-1999
EP 885644 A	23-12-1998	JP 11005006 A	12-01-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Abkürzungen PCT/EP 99/09288	
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 B01J20/26 B01D61/14 C12N15/10	
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK	
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 B01J C12N	
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen	
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)	
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile
P, X	WO 99 11695 A (AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES) 11. März 1999 (1999-03-11) Seite 9, Zeile 24; Ansprüche 1,5,11,14,19
X	EP 0 541 356 A (TSURU SUMIAKI) 12. Mai 1993 (1993-05-12) Seite 4, Zeile 6 - Zeile 11
X	US 4 143 201 A (YUTAKA MIYASHIRO) 6. März 1979 (1979-03-06) Spalte 1, Zeile 4 - Zeile 5 Spalte 1, Zeile 48
X	WO 95 31553 A (INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 23. November 1995 (1995-11-23) Seite 2, Zeile 5 - Zeile 14
	-/-
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div>	
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>	
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
8. März 2000	23/03/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018	Hilgenga, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/09288

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 158 884 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES) 23. Oktober 1985 (1985-10-23) Seite 9, Zeile 1 - Zeile 5; Ansprüche 1,3,4	1,2,11, 12,24,25
X	US 5 281 338 A (HARRIS RALPH ET AL) 25. Januar 1994 (1994-01-25) Spalte 2, Zeile 25 - Zeile 28	1,24
X	US 5 155 144 A (J.L. MANGANARO) 13. Oktober 1992 (1992-10-13) Spalte 2, Zeile 51 - Zeile 59 Spalte 3, Zeile 3 - Zeile 10	1,5, 11-13, 24,26-28
A	WO 98 08594 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 5. März 1998 (1998-03-05) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-3,9-11,45,46,48,65	13-17, 21-23
A	EP 0 885 644 A (NGK INSULATORS) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Spalte 1, Zeile 54 -Spalte 2, Zeile 2; Ansprüche 1,2	1,24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09288

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9911695 A	11-03-1999	DE 19737481 A	04-03-1999
		AU 9532798 A	22-03-1999
EP 541356 A	12-05-1993	JP 2032301 C	19-03-1996
		JP 5123511 A	21-05-1993
		JP 7049087 B	31-05-1995
		DE 69204255 D	28-09-1995
		DE 69204255 T	14-03-1996
		KR 9702182 B	25-02-1997
		US 5352418 A	04-10-1994
US 4143201 A	06-03-1979	JP 1310904 C	11-04-1986
		JP 52142789 A	28-11-1977
		JP 60035110 B	13-08-1985
		JP 1216923 C	17-07-1984
		JP 52050352 A	22-04-1977
		JP 58050256 B	09-11-1983
		DE 2646879 A	05-05-1977
		DK 470676 A	22-04-1977
		FR 2328732 A	20-05-1977
		GB 1577955 A	29-10-1980
		NL 7611565 A	25-04-1977
		SE 427932 B	24-05-1983
		SE 7611646 A	22-04-1977
		US 4493894 A	15-01-1985
		BE 847467 A	20-04-1977
WO 9531553 A	23-11-1995	DE 4417879 A	23-11-1995
		DE 4447388 A	27-06-1996
		AU 699552 B	10-12-1998
		AU 2614195 A	05-12-1995
		CA 2190149 A	23-11-1995
		EP 0759993 A	05-03-1997
		HU 76087 A	30-06-1997
		JP 10500297 T	13-01-1998
EP 158884 A	23-10-1985	JP 1787407 C	10-09-1993
		JP 4075214 B	30-11-1992
		JP 60226830 A	12-11-1985
		US 4830752 A	16-05-1989
		US 4897198 A	30-01-1990
		US 5002669 A	26-03-1991
		US 5059328 A	22-10-1991
US 5281338 A	25-01-1994	AT 122025 T	15-05-1995
		CA 2089168 A	11-02-1992
		DE 69109485 D	08-06-1995
		DE 69109485 T	18-01-1996
		EP 0542859 A	26-05-1993
		WO 9202460 A	20-02-1992
		GB 2263695 A,B	04-08-1993
US 5155144 A	13-10-1992	AU 8853991 A	26-05-1992
		WO 9207640 A	14-05-1992
WO 9808594 A	05-03-1998	EP 0826413 A	04-03-1998
		EP 0826412 A	04-03-1998
		AU 4455797 A	19-03-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09288

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9808594 A		EP 0958035 A	24-11-1999
EP 885644 A	23-12-1998	JP 11005006 A	12-01-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.